

(12) МЕЖДУНАРОДНАЯ ЗАЯВКА, ОПУБЛИКОВАННАЯ В СООТВЕТСТВИИ С  
ДОГОВОР О ПАТЕНТНОЙ КООПЕРАЦИИ (РСТ)

(19) ВСЕМИРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ  
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ  
Международное бюро



(43) Дата международной публикации:  
22 марта 2001 (22.03.2001)

PCT

(10) Номер международной публикации:  
WO 01/19341 A1

(51) Международная патентная классификация<sup>7</sup>: A61K  
9/107, 31/02

(21) Номер международной заявки: PCT/RU00/00362

(22) Дата международной подачи:  
11 сентября 2000 (11.09.2000)

(25) Язык подачи: русский

(26) Язык публикации: русский

(30) Данные о приоритете:  
99119464 10 сентября 1999 (10.09.1999) RU

(71) Заявитель (для всех указанных государств, кроме  
(US): ИНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ГЕНЕТИ-  
КИ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК (ИМГ  
РАН) [RU/RU]; 123182 Москва, пл. Академика Кур-  
чатова, д. 2 (RU) [INSTITUT MOLEKULARNOI  
GENETIKI ROSSIJSKOI AKADEMII NAUK  
(IMG RAN), Moscow (RU)].

(72) Изобретатели; и

(75) Изобретатели/Заявители (только для (US): БЕДА  
Наталья Владимировна [RU/RU]; 117312 Москва,  
ул. Вавилова, д. 43, кв. 28 (RU) [BEDA, Nataliya  
Vladimirovna, Moscow (RU)]. ГОРДИН Владимир  
Александрович [RU/RU]; 125503 Москва, ул.  
Лавочкина, д. 37, кв. 27 (RU) [GORDIN, Vladimir  
Alexandrovich, Moscow (RU)]. НЕДОСПАСОВ  
Андрей Артурович [RU/RU]; 117312 Москва, ул.  
Вавилова, д. 43, кв. 28 (RU) [NEDOSPASOV, An-  
drei Arturovich, Moscow (RU)]. РАФИКОВ Руслан  
Робертович [RU/RU]; 117279 Москва, ул. Остро-

вятинова, д. 35а, (RU) [RAFIKOV, Ruslan Rober-  
tovich, Moscow (RU)]. РАФИКОВА Ольга Вале-  
риевна [RU/RU]; 117279 Москва, ул. Островитя-  
нова, д. 35а, (RU) [RAFIKOVA, Olga Valerievna,  
Moscow (RU)]. СУНЦОВА Татьяна Павловна  
[RU/RU]; 141700 Московская обл., Долгопруд-  
ный, Институтский пер., д. 9, корп. 8, кв. 203-1  
(RU) [SUNTSOVA, Tatiyana Pavlovna, Dolgor-  
rudny (RU)].

(74) Общий представитель: ИНСТИТУТ МОЛЕКУ-  
ЛЯРНОЙ ГЕНЕТИКИ РОССИЙСКОЙ АКА-  
ДЕМИИ НАУК (ИМГ РАН); 123182 Москва, пл.  
Академика Курчатова, д. 2 (RU) [INSTITUT MO-  
LEKULARNOI GENETIKI ROSSIJSKOI  
AKADEMII NAUK (IMG RAN), Moscow (RU)].

(81) Указанные государства (национально): CA, JP, MX,  
US.

(84) Указанные государства (регионально): европей-  
ский патент (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,  
GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Опубликована

С отчётом о международном поиске.  
До истечения срока для изменения формулы  
изобретения и с повторной публикацией в случае  
получения изменений.

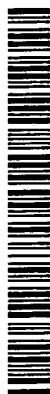
В отношении двухбуквенных кодов, кодов языков и дру-  
гих сокращений см. «Пояснения к кодам и сокращени-  
ям», публикуемые в начале каждого очередного выпуска  
Бюллетеня РСТ.

(54) Title: METHOD FOR MODULATING THE METABOLISM OF NITROGEN OXIDES, COMPOSITIONS THEREFOR  
(AND VARIANTS) AND METHOD FOR ACTING ON A PATIENT'S ORGANISM NECESSITATING THE  
METABOLISM OF NITROGEN OXIDES TO BE CORRECTED

(54) Название изобретения: СПОСОБ МОДУЛЯЦИИ МЕТАБОЛИЗМА ОКСИДОВ АЗОТА, КОМПОЗИЦИЯ ДЛЯ  
ЕГО РЕАЛИЗАЦИИ (ВАРИАНТЫ) И СПОСОБ ВОЗДЕЙСТВИЯ НА ОРГАНИЗМ ПАЦИЕНТА, НУЖДАЮЩЕГОСЯ  
В КОРРЕКЦИИ МЕТАБОЛИЗМА ОКСИДОВ АЗОТА

(57) Abstract: The invention relates to a process of modification of the nitrogen oxides metabolism by means of modification  
of the micellar catalysis parameters of NO oxidation. According to the invention, the number of phases and/or the volume ratio  
of the phases and/or the coefficients of distribution of NO and O<sub>2</sub> between the phases are modified. The number of phases is  
modified by using perfluorocarbons, haloid derivatives thereof and perfluoralkylamines with a high coefficient of distribution of  
NO and O<sub>2</sub>, which are used as a hydrophobic phase for micellar analysis. The invention also relates to compositions used to vary  
the output of nitrite, nitrate, nitrosothiols and other oxidation products, whereby said compositions include emulsions of  
perfluororganic compounds, catalysts and inhibitors of excessive nitrosation, reducers, free radical scavengers and nitrosation  
targets which modify the balance of the nitrosated biogeneous compounds. The inventive methods for acting on a patient's  
organism include using such compositions together with variations in temperature and moisture and with traditional drugs.  
Independent claims in this invention also relate to the use of the known blood replacement substances containing perfluorated  
compounds and of the steam bath or the sauna in order to accelerate NO oxidation.

[Продолжение на след. странице]



WO 01/19341 A1



---

(57) Реферат:

Заявляется способ изменения метаболизма оксидов азота изменением параметров мицеллярного катализа окисления NO. Цель достигается изменением числа фаз и/или изменением отношений объемов фаз и/или изменением коэффициентов распределения NO и O<sub>2</sub> между фазами. Для изменения числа фаз использованы перфторуглеводороды, их галоидные производные и перфторалкиламины с высокими коэффициентами распределения NO и O<sub>2</sub>, служащие гидрофобной фазой при мицеллярном катализе. Для варьирования выходов нитрита, нитрата, нитрозотриолов и других продуктов окисления заявлены композиции, включающие эмульсии перфторорганических соединений, катализаторы и ингибиторы перенитрозирования, восстановители, поглотители свободных радикалов и мишени нитрозирования, изменяющие баланс биогенных нитрозосоединений. Способы воздействия на организм пациента включают использование этих композиций в комбинациях с изменениями температуры и влажности и использованием традиционных лекарственных средств. Применение известных кровезаменителей на основе перфторорганических соединений и парной бани или сауны для ускорения окисления NO также заявлены в виде независимых пунктов.

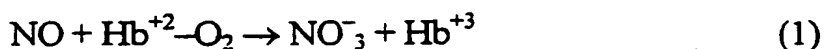
**Способ модуляции метаболизма оксидов азота, композиция для его реализации (варианты) и способ воздействия на организм пациента, нуждающегося в коррекции метаболизма оксидов азота.**

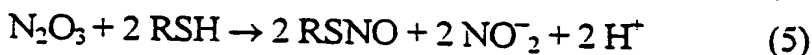
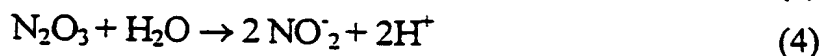
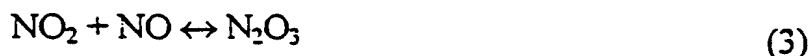
**Область техники.**

Изобретение относится к области химии, биохимии и медицины, в частности, к регуляции NO-зависимых процессов в живых организмах.

**Предшествующий уровень техники.**

Оксид азота (NO) — важнейший неорганический метаболит всех высших животных [1-5]. Он участвует в регуляции диаметра кровеносных сосудов [3] и септическом шоке [6], в передаче и хранении информации [4]; является исходным продуктом для синтеза пероксинитрита, который убивает патогенные бактерии и раковые клетки [7, 8], и выступает в качестве поглотителя свободных радикалов [9, 10]. У млекопитающих NO образуется в результате окисления аргинина кислородом под действием NO-синтаз [4, 11] и распадается при дальнейшем окислении. Нарушения метаболизма оксидов азота является причиной ряда заболеваний; напротив, для предупреждения и лечения многих патологий эффективны методы, позволяющие корректировать метаболизм оксидов азота (например, нитроглицерин — физиологический донор NO - используется при сердечной недостаточности). В газовой фазе NO окисляется кислородом до NO<sub>2</sub>. В разбавленных водных растворах, моделирующих условия *in vivo*, известны два основных конкурирующих пути окисления NO: комплексы переходных металлов, например, Hb-O<sub>2</sub>, быстро и необратимо окисляют NO в нитрат (1) — трехэлектронное окисление; в отсутствие переходных металлов свободный O<sub>2</sub> окисляет NO до нитрита или нитрозосоединений с промежуточным образованием N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> — одноэлектронный процесс (2) [1, 5, 12].





*In vivo* нитрит и нитрозотиолы могут снова восстанавливаться в NO [5, 13-  
5 15]. Таким образом, отношение скоростей процессов (1) и (2-5) регулирует пул  
NO и NO-эквивалентов, а через них важнейшие функции организма в норме и  
патологиях [5, 10, 16].

Для коррекции метаболизма оксидов азота используют доноры NO,  
например, органические нитраты, ингибиторы NO-синтаз, например,  
10 нитроаргинин, ферменты, разрушающие аргинин (предшественник NO),  
например, аргиназы, и др [5].

Известными способами ускорения химических реакций, в т.ч. (2),  
являются увеличение концентраций реагирующих веществ (реакция (2)  
суммарно третьего порядка), достигаемое различными методами, и повышение  
15 температуры. Для биохимических и медицинских приложений этот путь  
находит применение, например, введением доноров NO типа нитроглицерина,  
или ингаляции NO, но ограничен, поскольку допустимые концентрации NO и  
кислорода задаются физиологией. Во многих случаях (например, при  
септическом шоке) целью ускорения реакции (2) является необходимость  
20 локального уменьшения концентрации NO с одновременным увеличением  
концентраций продуктов окисления (например, нитрозотиолов, выполняющих  
различные физиологические функции, включая транспорт NO в виде NO-  
эквивалентов).

Известен также способ ускорения окисления NO в результате  
25 мицеллярного катализа [1, 2], при этом гидрофобная фаза действует как губка,  
концентрируя реагенты в малом объеме. В [1] способ реализован  
экспериментально при добавке к гомогенному водному раствору эмульсий,  
содержащих гидрофобные компоненты, например, липосом. При этом  
скорость реакции, наблюдаемая по убыли концентрации NO, возрастала, т.е.  
30 было показано, что скорость окисления в гетерогенной среде выше, чем в  
гомогенной, хотя продукты, образующиеся при окислении собственно NO, не

были определены. Одновременно в [1] без доказательства принималось, что зависимость достигаемого ускорения от доли добавляемой гидрофобной фазы монотонна (с увеличением доли гидрофобной фазы скорость реакции непрерывно растет).

5 Наиболее близким аналогом предлагаемого технического решения можно считать работу [2], в которой было теоретически показано, что эта зависимость имеет максимум при относительно малых долях гидрофобной фазы, при дальнейшем увеличении доли гидрофобной фазы скорость реакции падает, предложена формула для расчета ускорения процесса окисления NO в  
10 многокомпонентных системах. Эту работу можно принять за прототип. Однако, в [2] не был предложен практически применимый способ ускорить реакцию одноэлектронного окисления NO в гетерогенной среде живого организма, например, в крови. В опубликованном тексте статьи также содержалась алгебраическая ошибка в формуле. В статье [17] ошибки в  
15 работах [1, 2] были проанализированы.

Из уровня техники неизвестно, как модулировать метаболизм оксидов азота (т. е. ускорить или замедлить реакцию окисления NO и последующие превращения) в изначально гетерогенной системе (один из практически  
20 важных случаев - в крови), не изменяя ни количеств реагирующих веществ, ни температуры и давления в системе. Неизвестны также методы, позволяющие изменять отношение продуктов реакций одно- и трехэлектронного окисления без добавления дополнительных реагентов.

Известны стабилизированные эмульсии на основе фторированных органических соединений, применяемые в качестве кровезаменителей с  
25 газотранспортной функцией, например, «Перфторан» [18]. Имеется патент на использование таких эмульсий в качестве резервуаров (депо) для оксида азота [19]. Известны также многочисленные клинические применения кровезаменителей на основе стабилизированных эмульсий фторированных органических соединений [18-22].

Известен пептид Met-Glu-His-Phe- Pro-Gly-Pro [23], являющийся основной фармацевтических препаратов ноотропного действия. Влияние его на реакции перенитрозирования неизвестно.

Известны терапевтические эффекты русской парной бани и сауны, но характер и механизмы их влияния на метаболизм оксидов азота неизвестны.

### Раскрытие изобретения.

Предлагаемое техническое решение по модуляции метаболизма оксидов азота варьированием скорости окисления NO состоит в изменении реакционной среды так, чтобы в ней возникла по крайней мере одна новая фаза и/или изменилось отношение объемов фаз, и/или по крайней мере для одной пары фаз изменились значения коэффициентов распределения  $Q_{NO}$  и/или  $Q_{O_2}$  так, чтобы значение выражения

$$H = \frac{\sum_{i=1}^{i=n-1} k_i Q_{NO,i}^2 Q_{O_2,i} X_i + k_n \left( 1 - \sum_{i=1}^{i=n-1} X_i \right)}{\left( 1 + \sum_{i=1}^{i=n-1} Q_{NO,i} X_i - \sum_{i=1}^{i=n-1} X_i \right)^2 \left( 1 + \sum_{i=1}^{i=n-1} Q_{O_2,i} X_i - \sum_{i=1}^{i=n-1} X_i \right)}$$

где  $H$  - ускорение реакции окисления NO кислородом в гетерогенной  $n$ -фазной системе в сравнении с наименее гидрофобной (водной) фазой,  $k_i$  - константа скорости реакции в  $i$ -той фазе,  $Q_{NO,i}$ ,  $Q_{O_2,i}$  - равновесный коэффициент распределения NO и  $O_2$  в  $i$ -той фазе,  $x_i$  - доля  $i$ -той фазы в общем объеме,

описывающего общее ускорение реакции (2) по всей системе (во всех фазах) изменилось. Это может быть достигнуто изменением концентраций веществ в отдельных фазах даже без введения в систему новых компонентов. Например, при потоотделении в парной бане ткани обезвоживаются, что приводит к увеличению концентраций растворенных веществ в водных фазах и увеличению объемной доли гидрофобных фаз. Первое приводит к возрастанию значений  $Q$ , второе - к возрастанию значений  $x$ , в результате общая скорость окисления NO и значение  $H$  изменяются. Результат может быть достигнут

также введением в реакционную среду более гидрофобного компонента (например, перфторуглеводорода) с высоким значением  $Q_{NO}$  и/или  $Q_{O_2}$ . Зависимость  $H$  от доли гидрофобных фаз ( $x$ ) для гетерогенных систем, реально встречающихся *in vivo*, имеет максимум при относительно невысоких значениях  $x$  (несколько процентов от общего объема), одновременно,  $H$  быстро растет с увеличением  $Q$  (см. рис. 1). Таким образом, при росте объема новой фазы с высокими значениями  $Q$  ускорение реакции (2) сначала быстро растет, достигает максимума и далее плавно падает. Для реальных гетерогенных систем *in vivo* при достаточно большом количестве новой гидрофобной фазы ускорение реакции из-за мицеллярного катализа становится меньше, чем в исходной системе, т.е. значение  $H$  уменьшается. Действительно, ткани организма, например, кровь, являются гетерогенными системами уже до введения фторсодержащих соединений, поэтому для них также эффективен мицеллярный катализ (роль гидрофобных фаз играют липиды, липопротеиды, мембраны клеток). Ускорение суммарного (по всем фазам) процесса окисления можно достичь только в относительно узкой зоне концентраций вводимого фторсодержащего соединения, при дальнейшем увеличении его объемной доли скорость суммарной реакции будет падать и в конце концов станет ниже, чем была до начала добавления. Таким образом, увеличением объема фазы с максимально высокими значениями  $Q$  можно и увеличивать (левая стрелка на рис. 1), и уменьшать (правая стрелка на рис. 1) общую скорость окисления  $NO$  по реакции (2).

Предлагаемая группа изобретений имеет изобретательский уровень – действительно, выдан патент США [19], где заявлено использование эмульсий перфторуглеводородов для увеличения концентрации  $NO$  в организме пациента – авторы предполагают, что  $NO$  будет растворяться в гидрофобной фазе, но пренебрегают окислением.

Особенностью изложенного выше общего способа, которая в одних случаях оказывается достоинством, а в ряде случаев - недостатком, является

одновременное увеличение скоростей радикальных реакций и трехэлектронного окисления NO с образованием нитрата. Причина этого явления состоит в том, что сольватация  $N_2O_3$ , способствующая его стабилизации, в гидрофобных фазах, в частности, в фазах с высоким содержанием фторорганических соединений, ниже, чем в воде. Соответственно, равновесие системы высших оксидов азота смещается в сторону образования  $NO_2$  и  $N_2O_4$ . Первый способствует протеканию радикальных реакций, в т.ч. образованию нитротирозина, второй вступает в реакции электрофильного нитрозирования, вторым продуктом которых является нитрат (см. рис. 2).

С целью создания возможности модулировать и этот процесс, т.е. усилить или ослабить его в зависимости от необходимости, в заявляемой группе изобретений предлагается несколько модификаций. Возможность регулировать время воздействия на метаболизм оксидов азота обеспечивается использованием перфторсоединений различной молекулярной массы и структуры, которые контролируют скорость их удаления из организма.

Для смещения равновесия в сторону  $N_2O_3$  в гетерогенную среду, в которой протекает окисление NO, по предлагаемому способу дополнительно вводят катализаторы перенитрозирования, способствующие протеканию реакций  $N_2O_3$  и других нитрозирующих агентов, например, N-нитрозотриптофана в составе белков, с мишенями нитрозирования, в частности, с водой (4), тиолами (5) или аминами. Необходимость одновременного введения нескольких катализаторов и/или ингибиторов может быть вызвана наличием многих параллельных реакций, поскольку каталитические эффекты для каждой из пар катализатор/реакция индивидуальны. Скорость окисления NO по реакции (2) при этом не изменяется, но стационарная концентрация  $N_2O_3$  падает, т.к. увеличивается скорость его распада. Соответственно, падают стационарные концентрации  $NO_2$  и  $N_2O_4$ , находящиеся с ним в подвижном равновесии, и скорости радикальных реакций и образования нитрата. Эти катализаторы и ингибиторы



могут быть введены как в водную фазу, так и в мицеллы гидрофобной фазы. Например, банная процедура может сопровождаться введением пептидных катализаторов перенитрозирования интраназально – быстро попадая в ткани мозга, они будут способствовать защите от повреждений специфических участков связывания.

Вторым путем решения этой задачи является увеличение площади поверхности границы раздела фаз, поскольку концентрация мишеней нитрозирования в экстремально гидрофобной фазе обычно низка (в частности, из-за низкой концентрации воды, являющейся одной из главных мишеней нитрозирования), и реакция протекает главным образом благодаря диффузии реагента через границу раздела в водную фазу. Практически этот вариант достигается уменьшением среднего размера частиц гидрофобной фазы при сохранении ее объемной доли.

Третим путем является добавка в реакционную смесь мишеней, способных проникать в гидрофобные фазы, нитрозоваться в них и выводить нитрозогруппу в водные фазы. Из-за возможности реакций перенитрозирования не только для  $N_2O_3$ , но и для других нитрозосоединений, в частности, нитрозотиолов и нитрозоаминов, тиолы и амины могут выполнять такую транспортную функцию. Поскольку нитрозоамины могут быть канцерогенны, тиолы предпочтительнее.

Четвертым путем является понижение температуры реакционной среды, поскольку скорость окисления NO кислородом от температуры зависит слабо, а стабильность  $N_2O_3$  быстро падает с ростом температуры.

Пятым путем смещения равновесия в сторону  $N_2O_3$  является увеличение стационарной концентрации NO, обратимо взаимодействующего с  $NO_2$ . Оно может быть достигнуто введением самого NO, например, ингаляцией, или его предшественников, например, органических нитратов, увеличением активности NO-синтаз, например, увеличением концентраций их субстратов и кофакторов, или усилением их экспрессии, или ускорением ресинтеза NO из нитрита и

нитрозотиолов. Последнее достигается введением восстановителей, например, аскорбиновой кислоты или ее солей. Катализаторами могут быть комплексы переходных металлов, например, меди. Введение в состав композиций проникающих в гидрофобную фазу скавенджеров (поглотителей) активных свободных радикалов, отличных от NO, также осуществимо, например, при использовании липофильных производных токоферола (токоферол ацетат).

Шестым путем смещения равновесия в сторону одноэлектронного окисления является увеличение эффективных мишеней нитрозирования в водной фазе. При этом локальная концентрация  $N_2O_3$  на границе раздела фаз падает из-за химических реакций с мишенями, что приводит к формированию более крутого градиента и ускорению диффузии и транспорта высших оксидов азота из гидрофобной фазы в водную, так что стационарные концентрации  $NO_2$  и  $N_2O_4$  уменьшаются. В варианте этого метода мишени после нитрозирования по аминогруппе отщепляют молекулу воды и распадаются с выделением свободного азота. Таким образом NO-эквивалент (продукт окисления NO) необратимо удаляется из системы (в отличие от нитрита и нитрозотиолов, способных снова восстанавливаться в NO – см. рис. 2), что приводит к уменьшению общего пула NO-эквивалентов в системе. В качестве мишеней такого вида могут быть использованы биосовместимые нетоксичные амиды с незамещенной аминогруппой, мочевины, соли карбаминовой, сульфаминовой и амидофосфорной кислот, гидрофобные первичные амины для реакций в неводных фазах.

Смещение равновесия оксидов азота в сторону  $NO_2$  и  $N_2O_4$  (т.е. увеличения доли радикальных реакций и трехэлектронного окисления) достигается увеличением концентраций кислорода, ингибиторов перенитрозирования, повышением температуры, уменьшением площади поверхности границы раздела фаз, уменьшением концентраций эффективных мишеней и исключением гидрофобных мишеней, способных нитрозоваться в гидрофобных фазах, и катализаторов перенитрозирования (денитрозилаз).

Одновременно заявляются композиции, позволяющие достичь модуляции метаболизма оксидов азота по различным вариантам предлагаемого метода. При этом испрашивается защита на применение известных стабилизированных эмульсий инертных фторсодержащих соединений, используемых в качестве кровезаменителей с газотранспортной функцией, по новому назначению. Помимо ускорения окисления NO те же композиции могут использоваться для его замедления. Следовательно, известные кровезаменители с газотранспортной функцией на основе фторсодержащих соединений можно использовать как для ускорения (при малых относительных объемах добавляемых гидрофобных соединений), так и для замедления процесса (при больших объемах). Граница перехода ускорения в замедление определяется уравнением для величины ускорения  $\dot{N}$ . Кроме того, часто в клинической практике необходимо убрать избыток NO и продуктов его окисления именно из водных фаз (например, при септическом шоке, когда избыток NO, генерируемого макрофагами, приводит к опасному падению давления крови). Таким образом, эмульсии на основе фторированных органических соединений выполняют функции модулятора, т.е. или ускорителя ( $\dot{N}$  возрастает), или замедлителя ( $\dot{N}$  убывает) суммарного процесса, или перевода его в искусственную гидрофобную фазу (возможно и при неизменном  $\dot{N}$ ) – в зависимости от требований в конкретном случае использования изобретения.

Для модуляции метаболизма оксида азота заявляются также композиции, содержащие, помимо фторсодержащих соединений, модулирующие добавки, включая катализаторы и/или ингибиторы перенитрозирования (денитрозилазы), мишени нитрозирования, восстановители, или их комбинации. Прототипом для таких композиций можно считать известный до подачи предшествующей заявки кровезаменитель «Перфторан». Недостатком прототипа применительно к цели данного изобретения является недостаточная избирательность его модулирующего действия, т.е. невозможность использовать для варьирования

(модуляции) процессов обмена оксидов азота в желаемую сторону без изменения скорости окисления NO.

Новшество имеет изобретательский уровень, т.к. ранее эффект мицеллярного катализа для изменения системы равновесий оксидов азота при окислении NO не был известен, в качестве действующего нитрозирующего интермедиата рассматривался  $N_2O_3$  [24]. Каталитический и ингибирующий эффект заявляемых модуляторов перенитрозирования (например, метионин- и гистидин-содержащих пептидов, полифосфатов и их металлокомплексов) и их вклад в изменение системы равновесий оксидов азота ранее не был известен.

Заявлены также композиции в виде эмульсий, кривые распределения частиц которых по размеру имеют более чем один максимум и/или полученные смешиванием нескольких композиций. Преимущество таких композиций состоит в том, что каждая из составных частей может иметь индивидуальный состав и выполнять отдельные функции. Например, благодаря тому, что мелкие мицеллы фагоцитируются некоторыми типами клеток (например, макрофагами), а крупные – нет, а выравнивание концентраций компонентов между отдельными мицеллами протекает достаточно медленно, использованием такой композиции можно независимо регулировать метаболизм оксидов азота как в макрофаге, продуцирующем большие количества NO, так и в окружающей его среде.

Одновременно заявляется способ воздействия на организм пациента, нуждающегося в коррекции метаболизма оксидов азота, с применением вариантов заявляемого способа модуляции метаболизма оксидов азота и/или композиций для его реализации.

Исследованию физиологических эффектов гидрофобных фторсодержащих соединений, в особенности, эмульсий на их основе, применяемых в качестве кровезаменителей, посвящено большое число работ. Механизм их действия объясняется обычно улучшением транспорта кислорода к тканям за счет лучшей растворимости его в гидрофобных фазах, чем в воде. Известен также патент [19], в котором заявлено применение эмульсий перфторуглеводородов в качестве

депо или транспортера оксида азота. В предлагаемом изобретении гидрофобные фазы, содержащие одно или несколько перфторсоединений, являются основной средой для протекания реакции окисления NO кислородом. Из-за эффекта мицеллярного катализа эта реакция может быть ускорена или замедлена в сравнении со скоростью в отсутствие перфторсоединений. По этой причине высшие оксиды азота преимущественно образуются в этих новых фазах и именно они являются источниками NO-эквивалентов, обладающих различными физиологическими эффектами. Заявляемые способы воздействия на организм пациента используют возможности метода модуляции метаболизма оксидов азота, т.е. общего или локального изменения их концентраций, применительно к разным случаям. Поскольку NO и нитрозотиолы выступают в роли EDRF и участвуют в агрегации тромбоцитов [5], заявляемые способы могут найти применение для профилактики и лечения ишемии, инфарктов, инсультов, патологий свертывания крови, гипертонии. При профилактике и лечении атеросклероза следует учесть, что липидная бляшка на стенке сосуда также действует как мицеллярный катализатор окисления NO и модулятор апоптоза окружающих клеток [5], поэтому необходимо введение дополнительных фаз, конкурирующих за связывание NO более эффективно, чем липиды тканей. Поскольку теоретический верхний предел для  $Q_{NO}$  у липидов менее 70 [2], а у перфторсоединений выше 70, их использование особенно эффективно. Наряду с комбинациями известных медикаментозных воздействий (доноры NO, ингибиторы NO-синтаз) на метаболизм оксидов азота заявлены способы, основанные на эффектах изменения температуры и/или влажности. Механизм эффекта также связан с активацией окисления NO и вызываемыми ей изменениями метаболизма NO. В условиях гипертермии защита организма от перегревания состоит в усиленном потоотделении – при испарении пота происходит охлаждение. Однако при одновременном действии высокой влажности испарение минимально, что вызывает еще более активное потоотделение. Благодаря тому, что содержание электролитов в поте ниже, чем

в тканях, организм при потении обезвоживается, одновременно растет концентрация растворенных веществ. (Сходный эффект может быть достигнут введением диуретиков, однако распределение концентраций растворенных веществ по тканям будет разным.) Это приводит к усилению эффективности мицеллярного катализа при окислении NO как за счет увеличения Q, так и за счет увеличения  $\chi$  (см. рис.1). Одновременно, повышение температуры приводит к диссоциации  $N_2O_3$ , а при более высоких температурах – и  $N_2O_4$ , что ведет к росту концентрации  $NO_2$  и активации радикальных реакций, являющихся существенным фактором цитотоксичности (см. рис. 2). В гидрофобных фазах с высокими концентрациями перфторорганических соединений и высокими Q этот процесс особенно эффективен. Соответственно, с использованием предлагаемых методов можно увеличивать NO-индуцируемую цитотоксичность, что может найти применение при лечении инфекционных и онкологических заболеваний. Варианты с особым температурным режимом для определенного органа или части поверхности тела используют те же принципы. Например, можно нагреть область опухоли для избирательного повышения цитотоксичности или охлаждать голову для снижения цитотоксичности и защиты клеток головного мозга.

Варианты с особым атмосферным режимом также основаны на регуляции метаболизма NO мицеллярным катализом. При увеличении концентрации кислорода увеличиваются скорости как синтеза NO из аргинина, так и окисления NO, скорость восстановления нитрита и нитрозотиолов падает [5]. Уменьшение концентрации действует в обратном направлении. Количественные концентрационные зависимости для этих процессов различны. В гидрофобных фазах фторсодержащих эмульсий изменение концентрации кислорода регулирует лишь скорость окисления NO.  $CO_2$  является модулятором окисления NO, нитрования и нитрозирования, поскольку дестабилизирует пероксинитрит, а бикарбонат является катализатором гидролиза  $N_2O_3$ .  $SF_6$  является биохимически инертным газом, хорошо растворимым в гидрофобных фазах и

модулирующих растворимость в них других газов, в частности,  $O_2$  и  $CO_2$ . Растворимость азота в гидрофобных фазах отлична от растворимости  $SF_6$ , таким образом, комбинацией парциальных давлений этих четырех газов можно регулировать метаболизм оксидов азота. Использование воздуха с примесью NO для дыхания применяется в клинической практике, таким образом, смеси с использованием всех пяти газов ( $O_2$ ,  $N_2$ ,  $CO_2$ ,  $SF_6$ , NO) в комбинации с композициями перфторсодержащих соединений являются существенным расширением возможностей направленно влиять на метаболизм оксидов азота при различных патологиях. Поскольку легкие являются одним из основных органов синтеза NO, заявлен способ с использованием ингаляции, что может найти применение при лечении бронхиальной астмы, гипоксии и отека легких, например, у горовосходителей.

Способы воздействия на организм с использованием композиций для наружного применения могут быть полезны при лечении ожоговых больных и при хирургических вмешательствах, при воспалении, когда появляется необходимость препятствовать цитотоксическому действию активированных макрофагов на поврежденных участках кожи.

#### Краткое описание фигур изобретения.

Рисунок 1. Зависимость увеличения скорости окисления NO кислородом в гетерогенной системе (H) от доли гидрофобной фазы (x) и коэффициента распределения (Q) между фазами. В результате изменений x и/или Q возможно как увеличение (левая стрелка), так и уменьшение общей скорости окисления во всех фазах.

Рисунок 2. Основные реакции метаболизма оксидов азота. NOS – NO-синтазы, Hb – гемоглобин. Реакция 1 – биосинтез NO окислением аргинина, реакции 2-4 ведут к необратимому удалению NO-эквивалентов из цикла оксидов азота, реакция 5 – процесс, активируемый мицеллярным катализом. Стационарные концентрации NO и продуктов окисления зависят от наличия катализаторов перенитрозирования и концентраций мишеней для

нитрозирования и для связывания свободных радикалов. Скорости восстановления нитрозотиолов (RSNO) зависят от R, присутствия катализаторов, восстановителей и от концентрации кислорода.

Рисунок.3. Типичная кинетика окисления NO кислородом в воде и в эмульсии перфторорганического соединения.

Рисунок 4. Изменение концентрации нитрита и нитрата в ходе эксперимента в опытной группе L-NAME.

Рисунок 5. Изменение концентрации нитрита и нитрата в ходе эксперимента в контрольной группе L-NAME

### Примеры осуществления изобретения.

Для иллюстрации эффекта мицеллярного катализа были получены кинетики окисления NO кислородом в воде, в плазме крови, в эмульсиях перфторсоединений в воде и в плазме крови после соллюбилизации перфторуглеводородов. Водный раствор NO добавляли к реакционной смеси, находящейся на воздухе при атмосферном давлении. Концентрации NO определяли спектрофотометрически с использованием гемоглобина и по количеству нитрита по завершении реакции. На рис. 3 приведена типичная кинетика накопления нитрита при отборе проб с интервалом 10 с. В продуктах определяли нитрит и нитрат. Определение концентрации нитрита по образованию азокрасителя реакцией Гриса производилось спектрофотометрически при 540 нм немедленно после отбора пробы и продувки аргоном. Нитрат определяли после восстановления в нитрит. Отношение начальных скоростей реакции окисления NO в присутствии эмульсии перфторуглеводородов и в дистиллированной воде  $W_{\text{ПФУ}}^0/W_{\text{H}_2\text{O}}^0$  иллюстрируется примерами 1-3. Отношение начальных скоростей реакции окисления NO в присутствии перфторсоединений, соллюбилизированной плазмой крови, и в нативной плазме  $W_{\text{ПФУ}}^0/W_{\text{плазма}}^0$  иллюстрируется примерами 4 и 5.



Пример	Гетерогенная смесь	$W^0_{\text{ПФУ}}/W^0_{\text{H}_2\text{O}}$
1	1% эмульсия перфтордекалина	$63 \pm 15$
2	1% эмульсия перфтороктилбромида	$45 \pm 10$
3	«Перфторан» - 20% эмульсия с размером частиц $0,03 \div 0,15$ мкм состава (в граммах): перфтордекалин, смесь изомеров - 13; $\text{C}_{12}\text{F}_{23}\text{N}$ - перфторметилциклогексилпиперидин - 6,5; Проксанол-268 ( $M_w=8\text{kD}$ ) - 4; $\text{NaCl}$ - 0,6; $\text{NaHCO}_3$ - 0,065; $\text{KCl}$ 0,039; $\text{MgCl}_2$ - 0,019; $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ - 0,02; глюкоза - 0,2; вода - 100	$40 \pm 10$
4	Перфтордекалин, солюбилизированный в плазме крови	$25 \pm 5$
5	Перфтороктилбромид, солюбилизированный в плазме крови	$14 \pm 5$

Пример 6. Мицеллярный катализ окисления NO in vivo. (Из-за неопределенности понятия «Лучший вариант осуществления изобретения» в предлагаемой группе изобретений пример 6 может рассматриваться как таковой, если это требуется).

Эксперимент выполнен на крысах - самцах нормотензивной линии Wistar весом 180-400 г. За сутки до эксперимента животным под кетаминным наркозом (5мг/100г интраперитонеально) вживляли полиэтиленовые катетеры. Бедренная артерия была катеризирована для подключения к датчику регистрации артериального давления (АД), а бедренная вена - для внутривенного введения лекарственных препаратов. АД и частоту сердечных сокращений (ЧСС) измеряли в брюшной аорте с помощью датчика давления, подключенного к компьютеру через усилитель и цифровой преобразователь. Животные были разделены на группы, каждая из которых состояла из контрольной и опытной подгрупп. Опытной подгруппе вводили Перфторан (5

мл/кг), контрольной - аналогичное количество модифицированного раствора Кребса-Гензелейта (КТ). Мониторинг АД и ЧСС продолжали в течение 1,5 ч после введения растворов. После регистрации исходного уровня АД первой группе (группа L-NAME) внутрибрюшинно вводили ингибитор NO-синтаз - метиловый эфир N<sup>ω</sup>-нитро-L-аргинина (50мг/кг) и через 1,5 ч, когда АД устанавливалось на постоянном уровне, NaNO<sub>2</sub> (1мг/кг). После стойкого снижения АД животным вводили Перфторан или КТ. Второй группе крыс (FC-группа) Перфторан или КТ вводили сразу после регистрации исходного уровня АД. Третьей группе (группа FCTh) сначала вводили α-липоевую кислоту - 200 мг/кг, и через 15 минут - Перфторан (или КТ). Перед началом каждого эксперимента, после того, как АД на фоне введения L-NAME и NaNO<sub>2</sub> устанавливалось на постоянном уровне, а также сразу после завершения мониторинга, из артериального катетера отбирали по 0.2 мл крови для анализа.

Группа L-NAME. И в опытной (n=10) и в контрольной (n=9) подгруппах среднее артериальное давление (САД) после введения L-NAME возрастало на 38±5 мм.рт.ст. Введение NaNO<sub>2</sub> снижало САД в обеих подгруппах на 25±4 мм.рт.ст. Последующее введение Перфторана опытной подгруппе вызывало быстрый (в течение 10 мин) подъем САД до значений, характерных для действия L-NAME, а затем медленное (в течение 30-40 мин) достоверное снижение до исходного уровня. В то же время введение контрольной подгруппе, на фоне действия L-NAME и NaNO<sub>2</sub>, раствора КТ приводило к постепенному недостоверному подъему САД. На фоне введения ингибитора NOS содержание нитритов и нитратов в плазме обеих подгрупп недостоверно снизилось, после инъекции NaNO<sub>2</sub> - количество нитрита увеличилось на 344±68 мкМ в опыте и на 362±73 мкМ в контроле, нитрата - на 87±15 мкМ опыте и на 76±16 в контроле. Введение Перфторана опытной подгруппе привело к достоверному изменению нитрит-нитратного баланса крови: содержание нитрита понизилось на 220±40 мкМ, содержание нитрата увеличилось на 157±12 мкМ. В контрольной подгруппе введение раствора КТ привело к незначительному (33±13 мкМ) снижению содержания нитрита и нитрата в плазме (см. рис. 4 и 5).

**Группа FC.** Введение Перфторана опытной подгруппе также привело к изменению нитрит/нитратного баланса крови. На фоне увеличения содержания нитрита на  $49 \pm 6$  мкМ, концентрация нитрата снизилась на  $23 \pm 8$  мкМ. В результате суммарное содержание продуктов окисления NO увеличилось. В контрольной подгруппе введение КГ привело к равномерному незначительному снижению концентрации обоих ионов на  $7 \pm 4$  мкМ.

Таким образом, в обеих сериях экспериментов введение в кровь новой фазы с более высоким значением коэффициентов распределения Q приводило к ускорению окисления NO. В группе NAME собственный синтез NO под действием NO-синтаз был заингибирован и NO мог образоваться только при восстановлении нитрита и тионитритов (см. рис.2). Активация окисления NO мицеллярным катализом в гидрофобных фазах приводила к росту концентраций  $\text{NO}_2$ , поэтому концентрация нитрита уменьшалась, а концентрация нитрата росла. В отсутствие ингибитора NO-синтаз биогенный NO смещал равновесие в сторону  $\text{N}_2\text{O}_3$ , при этом концентрация нитрита росла, а концентрация нитрата падала.

**Группа FCTh.**  $\alpha$ -липоевая кислота вызвала в обеих подгруппах недостоверное снижение САД, однако Перфторан, введенный опытной ( $n=10$ ) подгруппе на фоне действия тиола привел к быстрому подъему САД на  $16 \pm 4$  мм.рт.ст., а затем к постепенному достоверному падению САД на  $8 \pm 3$  мм.рт.ст. ниже исходного уровня. В контрольной ( $n=10$ ) подгруппе наблюдался незначительный подъем САД до исходного уровня на фоне введения КГ. Эти же значения САД сохранялись в контроле и через 1,5 часа после введения раствора. Введение Перфторана значительно повышает концентрации нитрита ( $46 \pm 6$  мкМ), но не нитрата. Таким образом, суммарное содержание нитрита и нитрата в крови увеличивается еще значительно, чем в группе FC.

Пример 6 показывает возможности практической реализации изобретения для ускорения окисления NO в крови при введении перфторсоединений и эффект модифицирующих добавок ингибиторов NO-синтаз и мишеней для нитрозирования.

Эффективность катализаторов перенитрозирования определяли по кинетике денитрозирования N<sup>1</sup>-нитрозотриптофана (NOW) в составе ацетильного производного или сывороточного альбумина при 32° и различных значениях pH по убыли поглощения при  $\lambda = 340$  нм или дифференциальной спектроскопией относительно реакции денитрозирования в буферном растворе, по отношению нитрит/нитрат или по анализу отношения продуктов нитрозирования. Примеры 7-17 иллюстрируют каталитическую и ингибиторную активность  $W^0/W^0_{\text{буфер}}$  соединений, использованных в заявленных композициях (нормировка на молярность буфера).

Пример	Вещество	Буфер сравнения, pH	$W^0/W^0_{\text{буфер}}$
7	Na <sub>5</sub> P <sub>3</sub> O <sub>10</sub>	Фосфат, 6,3	4
8	Na <sub>2</sub> MnАТФ	Фосфат, 6,3	0,7
9	Na <sub>3</sub> MnP <sub>3</sub> O <sub>10</sub>	Фосфат, 6,3	21
10	Na <sub>3</sub> MgP <sub>3</sub> O <sub>10</sub>	Фосфат, 6,3	11
11	Ala-Met	MOPS, 6 MOPS, 6	18
13	D-Arg	MOPS, 6 MOPS, 6	0,56
14	Gly-Asp	MOPS, 6	15
15	Gly-His	Hepes, 6,1	16
16	Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro	Фосфат, 5,9	310
17	Аскорбиновая кислота	Фосфат, 5,9	32

Примеры 18-34 иллюстрируют различные композиции, полученные модификацией базовых композиций. Кристаллизационная вода не указана, все аминокислоты L-ряда.

Пример	Исходная композиция	Добавлено (+) или удалено (-), в мг на 100 г	Примечания
18	Перфторан (пример 3)	+ 1200 SF <sub>6</sub>	Введен в виде газа
19		+ 1000 перфтороктилбромид + 400 фосфолипид	Введены в виде эмульсии с водной фазой Перфторана, средний размер мицелл 50 мкм.
20		+ 100 фруктоза + 30 аскорбиновая кислота + 30 аскорбат натрия + 100 аргинин + 50 липоевая кислота	
21		+50 Gly-Asp +50 Gly-His + 50 Ala-Met + 300 аскорбиновая кислота	
22		+ 30 Na <sub>5</sub> P <sub>3</sub> O <sub>10</sub> + 200 Na <sub>2</sub> MnATФ + 200 Gly-Gly-NH <sub>2</sub>	
23		+ 30 Na <sub>2</sub> AMФ + 50 Na <sub>2</sub> MgATФ	
24		+ 100 Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro	
25		+ 2300 аскорбиновая кислота + 1000 аскорбат натрия	
26		+1000 перфтордекалин + 1000 аскорбиновая кислота + 50 токоферол ацетат + 50 дитиотреитол + 400 фосфолипид + 5 ретинол ацетат + 120 триолеин + 500 натрий сульфамат + 500 Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro	

20

Пример	Исходная композиция	Добавлено (+) или удалено (-), в мг на 100 г	Примечания
27	26	+ 200 $\text{Na}_3\text{MnP}_3\text{O}_{10}$ + 100 тиомочевина + 50 натрий карбамат + 50 натрий амидофосфат	
28	25	+ 50 Ala-Met + 500 Met-Ala + His-Gly + 50 Asn + 50 Asp + 50 Gln + 50 Glu-Na + 20 дигидролипоевая кислота	
29		+ 200 пентадециламин + 50 диаминобутан + 20 дитиопропанол + 1000 аскорбиновая кислота	
30		- глюкоза + 200 фруктоза + 500 аскорбиновая кислота + 50 токоферол ацетат	
31		+ 500 сывороточный альбумин	
32	Перфтор-декалин	+ 5000 $\text{SF}_6$ + 50 тиомочевина + 50 дигидролипоевая кислота + 350 токоферол	Суспендировано ультразвуком, $\text{SF}_6$ введен в виде газа
33	Смесь равных частей композиций 24 и 25		
34	Смесь равных частей композиций 18-32		

Примеры 35-38 иллюстрируют способ воздействия на организм пациента.

Пример 35. На одинаковые по площади воспаленные ссадины ( $n=6$ ) накладываются компрессы из композиции 20 и плацебо, не содержащее перфторсоединений. Через сутки ссадины с композицией 20 не проявляют признаков воспаления, в сравнении с контролем.

Пример 36. Используется классическая рубленая русская парная баня, снабженная очагом с расположенным над ним котлом объемом 100 л. Очаг и котел окружены камнями, скрепленными глиняным раствором. Баня топится по-черному березовыми дровами и проветривается 1,5 ч после топки. Средняя температура на полке 65°, влажность 70%, 2 сеанса по 12 мин в неподвижном режиме с перерывом между сеансами 10 мин при 37° и влажности 88%. За 1 ч до сеанса и непосредственно после первого сеанса опытной группе (n=4) вводят интраназально 150 мкл в каждую ноздрю 0,1% водного раствора пептидного катализатора перенитрозирования, содержащего 80% Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro и 20% Met(S=O)-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro (смесь стереоизомеров по атому серы), контрольной группе (n=4) вводят плацебо. Через час после завершения второго сеанса проверяются быстрота реакции и способность к мобилизации внимания в серии контрольных тестов по завязыванию несимметричного узла. В опытной группе скорость безошибочного выполнения теста выше в 2,4 раза в сравнении с контрольной.

Пример 37. Используется классическая баня по примеру 36, 2 сеанса по 12 мин, как в примере 36. В пробах мочи, взятых непосредственно перед первым сеансом и через 30 мин после завершения второго сеанса, определяется сумма концентраций (нитрит + нитрат) как мера интенсивности окисления NO. Во второй пробе сумма выше в 1,3 раза.

Пример 38. Используется баня по примеру 36, 3 сеанса по 12 мин, как в примере 36. Опытной группе дополнительно ингаляцией вводится 0,5 мл композиции из примера 33 и используется охлаждение головы наложением сверху неплотно наполненного льдом герметичного полиэтиленового пакета. Интенсивность охлаждения контролируется самим участником эксперимента по достижению максимально комфортного состояния. В тесте по завязыванию асимметричного узла скорость безошибочного выполнения в опытной группе выше в 4,3 раза, чем в контрольной.

**Промышленная применимость.**

Предлагаемые изобретения практически осуществимы – так, перфторуглеводороды разрешено использовать как кровезаменители, при этом в кровяное русло вводят существенно большие количества перфторуглеводорода, чем требуется для достижения максимального ускорения реакции (максимального значения  $N$ ) в соответствии с уравнением для эффективности мицеллярного катализа. Промышленно выпускаются и разрешены к клиническому применению лекарственные формы на основе стабилизированных эмульсий фторсодержащих органических соединений [18].

Заявляемые композиции практически применимы, поскольку инертные биосовместимые фторсодержащие соединения, используемые как гидрофобные фазы, и стабилизаторы эмульсий выпускаются промышленностью, методы получения высокодисперсных эмульсий на их основе также известны. Для каждого класса модифицирующих добавок, входящих в композиции, имеются представители среди биосовместимых и нетоксичных природных или синтетических соединений, выпускаемых промышленностью. К соединениям, обладающим денитрозилазной активностью, относятся, в частности, фрагменты природных гормонов человека или их синтетические аналоги, разрешенные к клиническому применению и выпускаемые промышленностью, например, метионил-гистидил-содержащий пептид - препарат ноотропного действия “Семакс” (Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro). Имеются восстановители (например, аскорбиновая кислота) и сквенджеры свободных радикалов (например, токоферол-ацетат), выпускаемые промышленностью. Арсенал промышленно выпускаемых мишеней для нитрозирования, в т.ч. применяемых в качестве фармпрепаратов, также широк (например, липоевая и дигидролипоевая кислоты). Искусственная гипер- или гипотермия широко используется как в клинике, так и в народной медицине (например, парная баня, сауна).



- [1] Liu, X., et al (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 2175-2179.
- [2] Gordin, V.A., Nedospasov, A.A. (1998) *FEBS Letters* **424**, 239-242.
- [3] Gow, A.J., Stamler, J.S. (1998) *Nature* **391**, 169-173.
- [4] Mayer, B., Hemmens, B.N. (1997) *Trends Biochem. Sci.* **22**, 477-481.
- 5 [5] Nedospasov, A.A. (1998) *Biochemistry (Moscow)* **63**, 881-904.
- [6] Kuhl, S.J., Rosen, H. (1998) *West. J. Med.* **168**, 176-181.
- [7] Pryor, W.A., Squadrito, G.L. (1995) *Am. J. Physiol.* **268**, L699-L722.
- [8] Xie, K., Fidler, I.J. (1998) *Cancer Metastasis Rev* **17**, 55-75.
- [9] Gorbunov, N.V. et al (1998) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **244**, 647-651.
- 10 [10] Darley-Usmar, V., Wiseman, H., Halliwell, B. (1995) *FEBS Lett* **369**, 131-135.
- [11] Stuehr, D.J. (1997) *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **37**, 339-359.
- [12] Liu, X., et al. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 18709-18713.
- [13] Reutov, V.P., Sorokina, E.G., Kaiushin, L.P. (1994) *Vop. Med. Khim.* **40**, 31-35.
- [14] Singh, R.J., Hogg, N., Joseph, J., Kalyanaraman, B. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**,  
15 18596-18603.
- [15] Kashiba-Iwatsuki, M., et al (1997) *J. Biochem. (Tokyo)* **122**, 1208-1214.
- [16] Whittle, B.J. (1995) *Histochem. J.* **27**, 727-737.
- [17] Beda, N.V., Suntsova, T.P. (1999) *FEBS Letters* **453**, 229-235.
- [18] Patent RU 2088217 C1, 27.08.1997
- 20 [19] Patent USA 5,726,209 (1998)
- [20] Adv. in blood substitute research. (eds Bolin R.B. et al) Alan R.Liss, Inc., NY  
(1983).
- [21] Riess, J.G. (1994) *Artif. Cells Blood Substit Immobil. Biotechnol.* **22**, 215-34.
- [22] Patent USA. 5,733,939 (1998).
- 25 [23] Patent USSR 939440.
- [24] Caulfield, J.L., et al (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 25859-25863.

**Формула изобретения:**

1. Способ модуляции метаболизма оксидов азота варьированием скорости окисления NO в гетерогенной среде изменением ее состава, отличающийся тем, что изменяют число фаз в этой среде и/или одно или несколько отношений объемов фаз и/или один или несколько коэффициентов распределения NO или кислорода между фазами.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что для ускорения окисления NO кислородом изменения проводят так, чтобы значение выражения

$$H = \frac{1 + \sum_{i=1}^{i=n-1} \frac{k_i}{k_n} Q_{NO,i}^2 Q_{O_2,i} x_i - \sum_{i=1}^{i=n-1} x_i}{\left(1 + \sum_{i=1}^{i=n-1} Q_{NO,i} x_i - \sum_{i=1}^{i=n-1} x_i\right)^2 \left(1 + \sum_{i=1}^{i=n-1} Q_{O_2,i} x_i - \sum_{i=1}^{i=n-1} x_i\right)}$$

10 где H - ускорение реакции окисления оксида азота в n-фазной гетерогенной системе в сравнении с водной фазой,  $k_i$ - константа скорости реакции в i-той фазе,  $Q_{NO,i}$ ,  $Q_{O_2,i}$ - равновесные коэффициенты распределения NO и O<sub>2</sub> в i-той фазе,  $x_i$ - доля i-той фазы в общем объеме

увеличилось, а для замедления окисления NO кислородом изменения  
15 проводят так, чтобы значение H уменьшилось.

3. Способ по любому из пп. 1, 2, отличающийся тем, что для изменения коэффициентов распределения NO между фазами изменяют количественный состав среды без изменения качественного состава и/или без образования новых фаз.

4. Способ по любому из пп. 1-3, отличающийся тем, что в гетерогенную среду вводят один или несколько компонентов, так что в ней появляется одна или несколько новых фаз.
5. Способ по любому из пп. 1-4, отличающийся тем, что вводимые компоненты содержат одно или несколько соединений из группы: перфторуглеводород, галогензамещенное производное перфторуглеводорода, третичный перфторалкиламин,  $SF_6$ .
6. Способ по любому из пп. 1-5, отличающийся тем, что вводимые компоненты содержат раствор белка, солюбилизировавшего фторсодержащее органическое вещество со значением коэффициентов распределения  $Q_{NO}$  и/или  $Q_{O_2}$  в двухфазной системе с водой более высоким, чем максимальное из значений  $Q_{NO}$  и/или  $Q_{O_2}$  для произвольной пары фаз реакционной смеси до введения.
7. Способ по любому из пп. 1-6, отличающийся тем, что гетерогенная среда является плазмой крови.
8. Способ по любому из пп. 1-6, отличающийся тем, что гетерогенная среда является кровью.
9. Способ по любому из пп. 1-8, отличающийся тем, что дополнительно вводят компоненты, содержащие один или несколько катализаторов и/или ингибиторов перенитрозирования.
10. Способ по любому из пп. 1-9, отличающийся тем, что дополнительно вводят компоненты, содержащие один или несколько восстановителей.
11. Способ по любому из пп. 1-10, отличающийся тем, что дополнительно вводят компоненты, содержащие один или несколько скавенджеров свободных радикалов.
12. Способ по любому из пп. 1-11, отличающийся тем, что дополнительно вводят компоненты, содержащие одно или несколько соединений, образующих при действии продуктов окисления NO нитрозосоединение и/или выделяющих азот.

13. Способ по любому из пп. 1-12, отличающийся тем, что дополнительно изменяют температуру гетерогенной среды или ее части.

14. Композиции, содержащие перфторорганическое соединение, устойчивое в реакциях метаболизма и образующее с водой гетерогенную

5 смесь, выбранное из группы: перфторуглеводороды, галоидные производные перфторуглеводородов, перфторалкиламины – 0,1-90%, и одно или несколько соединений из группы:  $\text{SF}_6$ , перфторуглеводороды, галоидные производные перфторуглеводородов, третичные перфторалкиламины, вода – до 100% для модуляции метаболизма оксидов  
10 азота.

15. Композиции по п. 14, отличающиеся тем, что в их состав дополнительно введены одно или несколько соединений, принадлежащих к одной или нескольким группам из перечня: эмульгаторы, биосовместимые соли для поддержания значений pH и/или ионной силы, углеводы для  
15 поддержания осмотического давления, и одно или несколько соединений, принадлежащих к одной или нескольким группам из перечня: катализаторы или ингибиторы перенитрозирования, восстановители, скавенджеры свободных радикалов, мишени для нитрозирования и/или их предшественники, мишени для нитрозирования с выделением азота.

20 16. Композиции по п. 15, отличающиеся тем, что в качестве эмульгаторов введены сополимеры окиси этилена и окиси пропилена и/или фосфолипиды.

17. Композиции по любому из пп.15, 16, отличающиеся тем, что они являются эмульсиями фторсодержащих соединений со средним размером  
25 мицелл менее 100 нм.

18. Композиции по любому из пп.15-17, отличающиеся тем, что в качестве углеводов для поддержания осмотического давления введена глюкоза и/или фруктоза и/или сахароза.

19. Композиции по любому из пп.15-18, отличающиеся тем, что в качестве восстановителей введена аскорбиновая кислота и/или ее соли и/или ретинол и/или его ацильные производные.

20. Композиции по любому из пп.15-19, отличающиеся тем, что в качестве катализаторов или ингибиторов перенитрозирования введены одно или несколько замещенных или незамещенных моно- и/или ди- и/или полифосфатов и/или их комплексов с магнием или цинком или медью или марганцем.

21. Композиции по любому из пп.15-20, отличающиеся тем, что в качестве катализаторов или ингибиторов перенитрозирования введены одно или несколько соединений из группы: тиомочевина, тиамида, метионин, аргинин, пептиды и/или их ацильные и/или амидные производные общей формулой  $X\text{-Pept-Y}$ , где  $X = \text{H}$  или ацил,  $Y = \text{OH}$  или  $\text{-NH}_2$  или  $\text{NHR}$  или  $\text{NR}_1\text{R}_2$ , Pept = пептид, содержащий остатки метионина и/или аспарагиновой кислоты и/или гистидина и/или глутаминовой кислоты и/или аргинина.

22. Композиции по п.21, отличающиеся тем, что Pept содержит фрагмент Met-Glu-His-Phe.

23. Композиции по любому из пп.21 или 22, отличающиеся тем, что Pept = Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro, и все аминокислоты относятся к L-ряду.

24. Композиции по любому из пп.15-23, отличающиеся тем, что в качестве скавенджера свободных радикалов введены токоферол и/или его ацильные производные.

25. Композиции по любому из пп.15-24, отличающиеся тем, что в качестве мишеней для нитрозирования и/или их предшественников введены один или несколько тиолов или дитиолов или дисульфидов.

26. Композиции по любому из пп. 15-25, отличающиеся тем, что в качестве мишеней для нитрозирования и/или их предшественников введены одно или несколько соединений из группы: дитиопропанол,

дитиобутандиол, липоевая кислота, дигидролипоевая кислота, цистеин, гомоцистеин, пептиды, содержащие цистеин и/или цистин, ацильные и/или сложноэфирные и/или амидные производные цистеина или цистина или пептидов, содержащих эти аминокислоты, или белок.

5 27. Композиции по любому из пп.15-26, отличающиеся тем, что в качестве мишеней для нитрозирования с выделением азота введены одно или несколько соединений из группы: мочевины, сульфаминовая кислота и ее соли, амидофосфорная кислота и ее соли, карбаминовая кислота и ее соли, аспарагин, аспарагиновая кислота и ее соли, глутамин и его соли, 10 глутаминовая кислота и ее соли, аспарагин- и/или глутамин-содержащие пептиды, первичный амин или его соли.

28. Композиции по любому из пп.15-27, отличающиеся тем, что они являются эмульсиями, зависимости распределения числа частиц по размеру которых имеют более чем один максимум и/или композициями, 15 полученными смешиванием двух или более композиций по пп.14-27.

29. Применение кровезаменителей на основе стабилизированных эмульсий фторсодержащих соединений для изменения скорости окисления NO.

30. Способ воздействия на организм пациента, нуждающегося в коррекции метаболизма оксидов азота, отличающийся тем, что для изменения 20 скоростей окисления NO и последующих реакций изменяют число фаз в его организме и окружающей его среде и/или одно или несколько отношений объемов фаз и/или один или несколько коэффициентов распределения NO или кислорода между фазами.

31. Способ по п. 30, отличающийся тем, что пациенту вводят внутрь 25 композицию, содержащую одно или несколько фторсодержащих не смешивающихся с водой соединений, устойчивых в реакциях метаболизма, и/или эту композицию используют местно для контакта с участком кожного покрова или раны.

32. Способ по п. 31, отличающийся тем, что в состав композиции дополнительно введены одно или несколько соединений из группы: вода, эмульгатор, биосовместимые соли для поддержания значений pH и/или ионной силы, углеводы для поддержания осмотического давления и/или
- 5 одно или несколько соединений, принадлежащих к одной или нескольким группам из перечня: катализаторы или ингибиторы перенитрозирования, восстановители, сквенджеры свободных радикалов, мишени для нитрозирования и/или их предшественники, мишени для нитрозирования с выделением азота.
- 10 33. Способ по любому из пп. 31-32, отличающийся тем, что в состав композиции в качестве фторсодержащих не смешивающихся с водой соединений введены один или несколько соединений из группы перфторуглеводород, галоидное производное перфторуглеводорода, третичный перфторалкиламин, в качестве эмульгаторов введены
- 15 сополимеры окиси этилена и окиси пропилена и/или фосфолипиды и/или в качестве углеводов для поддержания осмотического давления введена глюкоза и/или фруктоза и/или сахароза и/или в качестве восстановителей введена аскорбиновая кислота и/или ее соли и/или ретинол и/или его ацильные производные, и/или в качестве катализаторов или ингибиторов
- 20 перенитрозирования введены одно или несколько замещенных или незамещенных моно- и/или ди- и/или полифосфатов и/или их комплексов с магнием или цинком или медью или марганцем и/или одно или несколько соединений из группы: тиомочевина, метионин, аргинин, пептиды и/или их ацильные и/или амидные производные общей формулой X- $\text{Pept}$ -Y, где X =
- 25 H или ацил, Y = OH или  $-\text{NH}_2$  или  $\text{NHR}$  или  $\text{NR}_1\text{R}_2$ ,  $\text{Pept}$  = пептид, содержащий остатки метионина и/или аспарагиновой кислоты и/или гистидина и/или глутаминовой кислоты и/или аргинина, и/или  $\text{Pept}$  содержит фрагмент Met-Glu-His-Phe и/или  $\text{Pept}$  = Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro, и/или в качестве сквенджера свободных радикалов введены

токоферол и/или его ацильные производные, и/или в качестве мишеней для нитрозирования и/или их предшественников введены один или несколько тиолов или дитиолов или дисульфидов и/или одно или несколько соединений из группы: дитиопропанол, дитиобутандиол, липоевая кислота, дигидролипоевая кислота, цистеин, гомоцистеин, пептиды, содержащие цистеин и/или цистин, ацильные и/или сложноэфирные и/или амидные производные цистеина или цистина или пептидов, содержащих эти аминокислоты, или белок, и/или в качестве мишеней для нитрозирования с выделением азота введены одно или несколько соединений из группы: мочевины, глутаминовая, аспарагиновая, карбаминовая, амидофосфорная, сульфаминовая кислоты и их соли, аспарагин, глутамин, первичный амин и их соли, аспарагин- и/или глутамин-содержащие пептиды.

34. Способ по любому из пп. 31-33, отличающийся тем, что одновременно или последовательно используется несколько композиций и/или композиции являются эмульсиями, зависимости распределения числа частиц по размеру которых имеют более чем один максимум, и/или композициями, полученными смешиванием двух или более композиций по любому из пп.30-32.

35. Способ по любому из пп. 31-34, отличающийся тем, что композицию вводят внутривенно.

36. Способ по любому из п. 31-35, отличающийся тем, что композицию вводят ингаляцией.

37. Способ по любому из п. 30-36, отличающийся тем, что пациенту дополнительно вводят катализаторы или ингибиторы перенитрозирования.

38. Способ по любому из пп. 30-37, отличающийся тем, что пациенту дополнительно вводят диуретики.

39. Способ по любому из п. 30-38, отличающийся тем, что пациенту дополнительно вводят ингибиторы NO-синтаз.



40. Способ по любому из пп. 30-39, отличающийся тем, что пациенту дополнительно вводят доноры NO и/или проводят ингаляцию NO.

41. Способ по любому из пп. 30-40, отличающийся тем, что пациент или один или несколько отдельных органов и/или частей тела дополнительно  
5 подвергаются воздействию гипертермии и/или инфракрасного излучения.

42. Способ по любому из пп. 30-41, отличающийся тем, что пациент или часть поверхности его тела находится в условиях увеличенной относительной влажности.

43. Способ по любому из пп. 30-42, отличающийся тем, что пациент или  
10 один или несколько отдельных органов и/или частей тела дополнительно подвергаются воздействию низких температур.

44. Способ по любому из пп. 30-43, отличающийся тем, что пациент и/или часть поверхности тела и/или отдельный орган дополнительно  
15 подвергается воздействию газовой смеси кислорода с одним или несколькими газами из группы  $\text{SF}_6$ ,  $\text{N}_2$ ,  $\text{CO}_2$ , NO при их парциальных давлениях, отличных от обычных в составе воздуха при атмосферном давлении, и/или эта газовая смесь используется для дыхания пациента.

45. Способ по любому из пп. 30-44, отличающийся тем, что пациент принадлежит к группе риска по септическому шоку или в состоянии  
20 септического шока.

46. Способ по любому из пп. 30-44, отличающийся тем, что пациент принадлежит к группе риска по гипоксии или отеку легких.

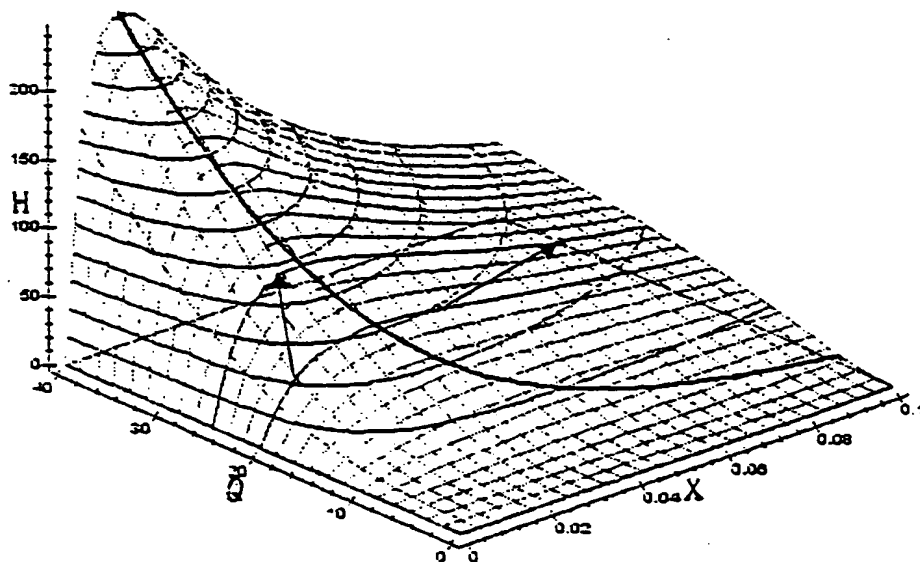
47. Способ по любому из пп. 30-44, отличающийся тем, что пациент принадлежит к группе риска по онкологическому заболеванию или  
25 онкологических больных.

48. Способ по любому из пп. 30-44, отличающийся тем, что пациент принадлежит к группе больных бронхиальной астмой.

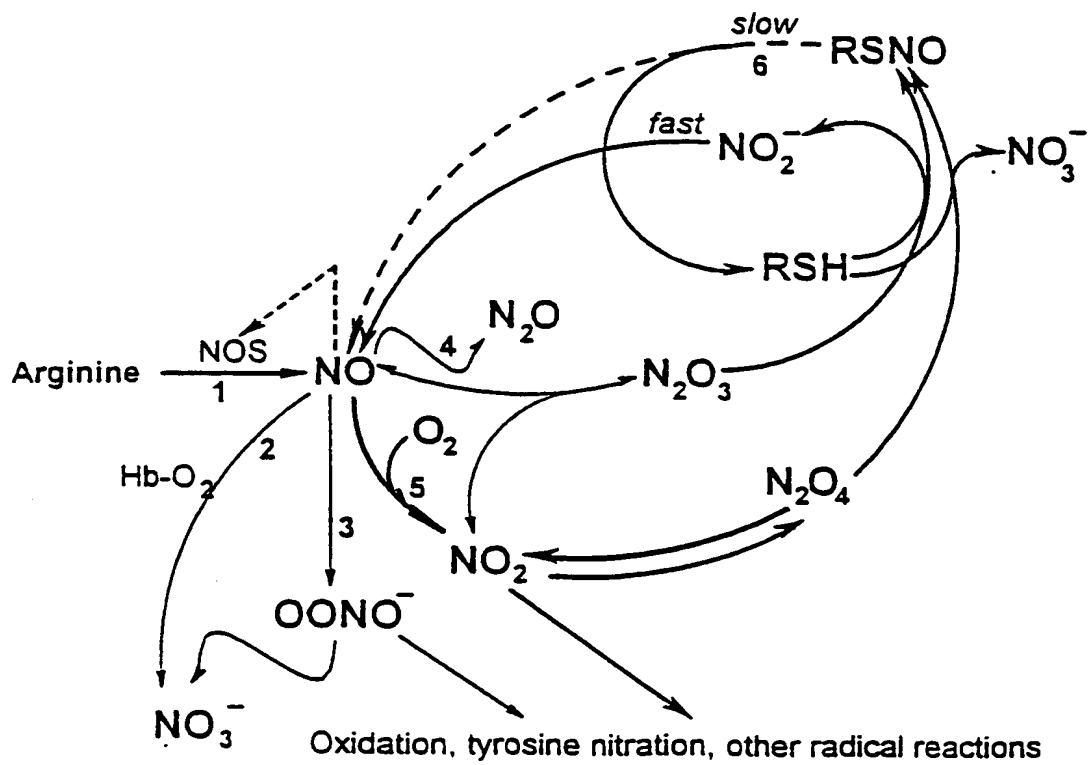
49. Способ по любому из пп. 30-44, отличающийся тем, что пациент принадлежит к группе больных инфекционным заболеванием.

50. Способ по любому из пп. 30-44, отличающийся тем, что пациент принадлежит к группе ожоговых больных.
51. Способ по любому из пп. 30-44, отличающийся тем, что пациент принадлежит к группе больных в послеоперационном периоде.
- 5 52. Способ по любому из пп. 30-44, отличающийся тем, что пациент принадлежит к группе риска по инсульту или перенесших инсульт.
53. Способ по любому из пп. 30-44, отличающийся тем, что пациент принадлежит к группе риска по инфаркту или перенесших инфаркт.
54. Способ по любому из пп. 30-44, отличающийся тем, что пациент
- 10 принадлежит к группе риска по атеросклерозу или больных атеросклерозом.
55. Способ по любому из пп. 30-44, отличающийся тем, что пациент принадлежит к группе риска по патологиям свертывания крови или имеет нарушения свертываемости крови.
- 15 56. Применение парной бани или сауны для модуляции метаболизма оксидов азота изменением скорости окисления NO.

I/2



Фиг. I



Фиг. 2



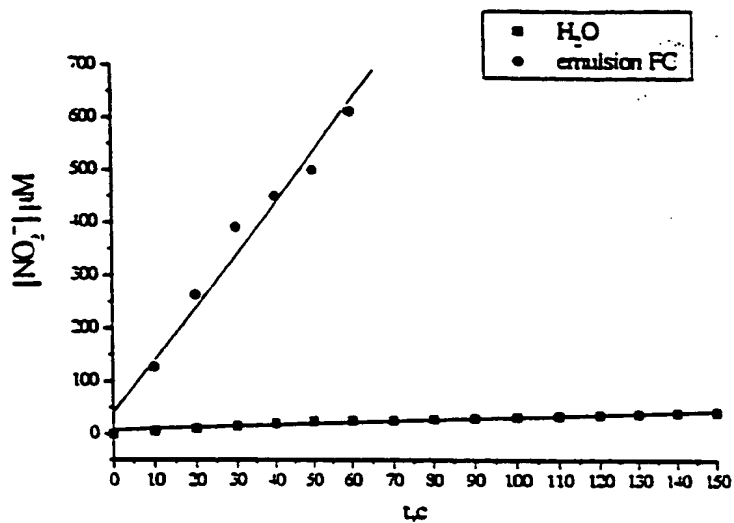
11

3

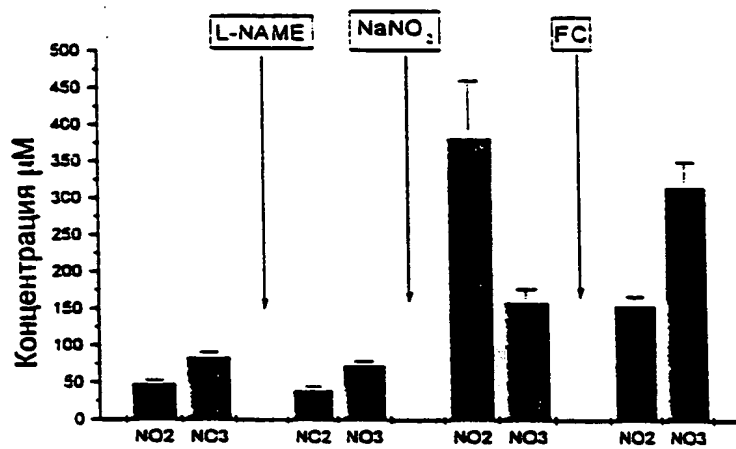
4

5

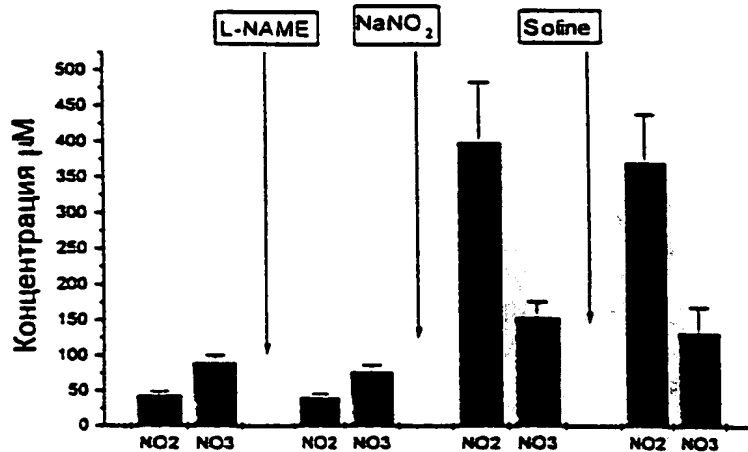
2/2



Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5



6

7

8

9

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/RU 00/00532

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER :

IPC 7 A61K9/107, A61K31/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K31/00, 31/02, 31/13, 33/16, 35/14, 35/16, 9/00, 9/107, 9/113, 31/375

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 96/30012 A1 (DEFEUDIS, FRANCIS, V.) 3 October 1996 (03.10.96), the claims	1-13, 30-55
A	EP 0307087 A1 (LONG, DAVID V., JR.) 15 March 1989 (15.03.89), the claims	14-28
A	WO 97/38579 A1 (BOARD OF REGENTS et al) 23 October 1997 (23.10.97), the claims	14-28, 29
A	WO 96/40058 A3 (ALLIANCE PHARMACEUTICAL CORP.) 19 December 1996 (19.12.96), the abstract	29
A	Malaya meditsinskaya entsiklopedya, under editorship V.I. POKROVSKOGO, volume 1, M. Sovetskaya entsiklopedya, 1991, pages 206-207	56

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C

☐ See patent family annex.

### \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search report  
25 December 2000 (25.12.00)

Date of mailing of the international search report  
11 Januar 2001 (11.01.01)

Name and mailing address of the ISA/  
R U

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



4

5

6

7



# ОТЧЕТ О МЕЖДУНАРОДНОМ ПОИСКЕ

Международная заявка N  
PCT/RU 00/00362

## A. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:

A61K9/107, A61K31/02

Согласно международной патентной классификации (МПК-7)

## B. ОБЛАСТИ ПОИСКА:

Проверенный минимум документации (система классификации и индексы) МПК-7:

A61K31/00, 31/02, 31/13, 33/16, 35/14, 35/16, 9/00, 9/107, 9/113, 31/375

Другая проверенная документация в той мере, в какой она включена в поисковые подборки:

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, поисковые термины):

## C. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ:

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
A	WO 96/30012 A1 ( DEFEUDIS, FRANCIS, V. ) 3 October 1996 (03.10.1996), формула	1-13, 30-55
A	EP 0307087 A1 (LONG, DAVID V.,JR.) 15.03.1989 . формула	14-28
A	WO 97/38579 A1 (BOARD OF REGENTS et al ) 23 October 1997 (23.10.1997), формула	14-28, 29
A	WO 96/40058 A3 (ALLIANCE PHARMACEUTICAL CORP. ) 19 December 1996 (19.12.1996) , реферат	29
A	Малая медицинская энциклопедия, под ред. В.И. ПОКРОВСКОГО, т.1, М., Советская энциклопедия, 1991, с.206-207	56

☐ следующие документы указаны в продолжении графы C.

☐ данные о патентах-аналогах указаны в приложении

\* Особые категории ссылочных документов:

A документ, определяющий общий уровень техники

E более ранний документ, но опубликованный на дату международной подачи или после нее

O документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.

P документ, опубликованный до даты международной подачи, но после даты испрашиваемого приоритета и т.д.

"P" документ, опубликованный до даты международной подачи, но после даты испрашиваемого приоритета

T более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения

X документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну и изобретательский уровень

Y документ, порочащий изобретательский уровень в сочетании с одним или несколькими документами той же категории

& документ, являющийся патентом-аналогом

"&" документ, являющийся патентом-аналогом

Дата действительного завершения международного поиска: 25 декабря 2000 (25.12.2000)

Дата отправки настоящего отчета о международном поиске: 11 января 2001 (11.01.2001)

Наименование и адрес Международного поискового органа:  
Федеральный институт промышленной собственности

Россия. 121858. Москва. Бережковская наб., 30-1  
Факс: 243-3337. телетайп: 114818 ПОДАЧА

Уполномоченное лицо:

К.Савченко

Телефон № (095)240-58-88



17

18

19  
20  
21  
22